

According to Figure 5b, a controllable current source I is used to create a magnetic field which attracts the magnetized dissected object 120. The controllable current source I supplies a current to an electromagnet 130 for creating the magnetic field.

English abstract of DE 201 11 939 U1:

This document relates to object carriers 1 which can be used for performing a laser microdissection method in a laser microscope system.

The object carrier 1 comprises a frame 3, whereby a barrier membrane 5 is fixed to the frame 3 by means of an adhesive 4. In addition, a carrier membrane 7 is attached to the surface of the barrier membrane by means of an additional adhesive 6. The barrier membrane 5 may have a thickness of 20 μm while the carrier membrane 7 may have a thickness of 0.9 μm . That surface of the carrier membrane 7, which faces the barrier membrane 5, is coated with magnetic polymers.

Figure 3 shows a receptacle 9, whereby a ring magnet 11 is provided at the bottom of the receptacle 9. A dissected biological object 12, comprising a corresponding portion of the preparation 2 and the carrier membrane 7 with the magnetic polymers, may be localized within the receptacle 9 by means of the magnetic attraction forces between the ring magnet 11 and the magnetic carrier membrane 7.

English abstract of DE 38 41 961 A1:

This document discloses in Figure 2 a device for the analysis of liquids.

The device comprises a plate holder 22, whereby a test plate 1 can be inserted into the plate holder 22 by means of a plate carrier 21. The plate holder 22 consists of a U-shaped guidance 23 and a selectively activatable electromagnet 24. The plate carrier 21 is held in the plate holder 22 through the magnetic attraction force between the electromagnet 24 and a small iron plate 26 attached to the front surface 25 of the plate carrier 21, whereby the electromagnet 24 and the small iron plate 26 in combination with the guidance 23 constitute a component of a transfer device for transferring the test plate 1 to a so-called extension module 13.

The extension module 13 comprises a rotary plate 70 with a plurality of storage positions 71 each assigned to one further plate holder 72, whereby each further plate holder 72 again consists of a U-shaped guidance 73 and an electromagnet 74.

The test plate 1 is transferred in that the plate carrier 21 is inserted into the extension module by means of a transport carriage 2 running along transport tracks 7, 7' such that the plate carrier 21 is located in the U-shaped guidance 73. Thereafter, the electromagnet 24 of the plate holder 22 is deactivated, whereby in turn the magnetic attraction force between the electromagnet 74 and a small iron plate 52 attached to the plate carrier 21 results in the plate carrier 21 being reliably held in the plate holder 72 of the extension module 13.



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Gebrauchsmusterschrift**
⑩ **DE 201 11 939 U 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
G 01 N 1/28
G 02 B 21/34
C 12 M 1/00

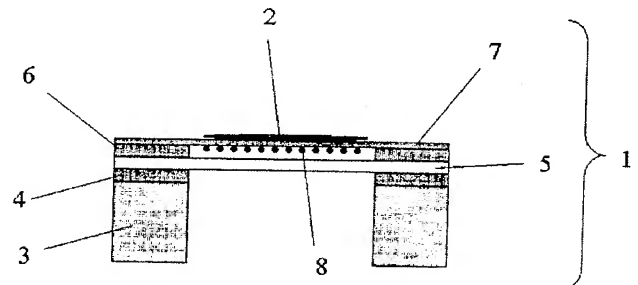
②① Aktenzeichen:	201 11 939.0
②② Anmeldetag:	15. 7. 2001
④⑦ Eintragungstag:	21. 11. 2002
④③ Bekanntmachung im Patentblatt:	2. 1. 2003

DE 201 11 939 U 1

- ⑦③ Inhaber:
Kölble, Konrad, Dr. Dr., 13465 Berlin, DE
- ⑦④ Vertreter:
Wehlan, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10315 Berlin

⑤④ **Mikroskopiereinrichtung und Objektträger zur Mikrodissektion**

- ⑤⑦ Mikroskopiereinrichtung der Mikrodissektion zur Isolation mikroskopischer Präparatanteile, bestehend aus Objektträgern, die aus mindestens einem magnetisierbaren oder magnetischen Träger aufgebaut sind.



DE 201 11 939 U 1

B 15.07.01

Mikroskopiereinrichtung und Objektträger zur Mikrodissektion

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft eine Mikroskopiereinrichtung zur Mikrodissektion und insbesondere Objektträger für mikroskopische Präparate zur Isolation eines interessierenden Präparatanteils, wobei die Objektträger insbesondere in Gestalt von Mehrfachfolien-Objektträgern (MFOT) der Lasermikrodissektion ausgebildet sind und die Objektträger aus mindestens einem magnetisierbaren oder magnetischen Träger bestehen.

10

In der Mikroskopie werden mikroskopische Präparate auf transparente Glas- oder Plastikobjektträger aufgebracht, um diese anschließend in die optische Achse eines Mikroskops einzubringen (Mikroskopie in Forschung und Praxis, H. Robenek (Hrsg.); GIT Verlag, Darmstadt, 1995).

- 15 Die Mikrodissektion ist ein Verfahren der Biowissenschaften, mit dem isolierte oder in einem Gewebe lokalisierte zelluläre, supra- und subzelluläre Strukturen abgetrennt werden und somit weiteren analytischen und präparativen Verfahren zugänglich gemacht werden können (Microdissection and its downstream tools, *J Mol Med* 2000;78(7):B19-B34).

Unter den Mikrodissektionsverfahren spielen die LCM-(Laser Capture Microdissection)-

- 20 Verfahren eine besondere Rolle, so

- bei der Gewebeübertragung gemäß WO 98/36261 mit Hilfe der Folie / des Films aus EVA (E/VA – Ethylen/Vinylacetat-Copolymere) als Material, wobei dem Film eine Dotiersubstanz zugesetzt wird; EVA als Polymer findet auch in anderen Fällen Verwendung (US 6157446, WO 00/68662)
- 25 – zur Selektion kleiner Zelltrauben (small clusters of cells) und biologischer Moleküle (WO 01/26460)
- bei der Entnahme von Gewebeproben (WO/9900658) oder
- zur Verringerung der Kontaminationsraten (WO0133190, auch US6215550).

Die Mikrodissektion kann manuell oder mikromanipulativ mechanisch mit Skalpell oder
30 Nadel in direktem Kontakt mit der Probe oder kontaktfrei mittels fokussierten Lasern ("Lasermikrodissektion", LMD) realisiert werden. In der US 5,998,129 z.B. wird ein LMD-Verfahren beschrieben: In einem ersten Schritt wird der interessierende Bereich einer auf konventionelle Glasobjektträger aufgetragenen Probe mit einem Laserstrahl in seiner

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Zirkumferenz vom umgebenden Gewebe abgetrennt. In einem zweiten Schritt wird der isolierte, noch dem Objektträger aufliegende Probenbereich mittels eines zusätzlichen, auf ihn gerichteten Laserimpulses in Richtung des Laserstrahles mobilisiert und in einem Reaktionsbehältnis aufgefangen. Dieses Verfahren wirkt auf den Gewebezusammenhang des interessierenden Probenbereichs zerstörend und erlaubt in den meisten Fällen keine morphologische Nachbeobachtung des Mikrodisektats. Besonders problematisch ist die direkte Exposition des interessierenden Probenbereichs mit hochenergetischer biologisch aktiver Laserstrahlung (z.B. N₂-Laser emittiertes UV-Licht der Wellenlänge 322nm). Mögliche schädigende Einwirkungen können durch Aufziehen des Präparateschnittes auf UV-absorbierende Folien in noch mittels Laser schneidbarer Dicke reduziert werden. Hierzu können transparente Polymerfolien entweder auf dem Objektträger randlich verklebt oder über einem Rahmen frei gespannt werden. In beiden Fällen kann bei hinreichend großen interessierenden Arealen durch die Verwendung eines aufrechten Mikroskops und die Anordnung des Gewebeschnittes über einem Reaktionsgefäß auf den zusätzlichen Laserimpuls zur Mobilisierung verzichtet werden, da ausreichend schwere Mikrodisektate allein durch die Erdanziehungskräfte in entsprechend positionierte Auffangbehältnisse verbracht werden. LMD-Verfahren werden in der Patentliteratur des weiteren genannt

- bei der membrangestützten Mikrodisektion, wobei als Trägermembranen UV-absorbierende Polymere vorgeschlagen worden sind, z.B. Polyester, Polyethylen oder Polycarbonat (DE 19818425 A1)
- zur Gewinnung von Gewebeproben (US 6204030)
- bei der Tumorerkennung (EP 1067374 = DE 19932032 A1) oder
- zur Gewinnung von biologischen Objekten, z.B. zur Separation von Zellen oder Zellorganellen aus Gewebeschnitten; wobei auf planaren Trägern mit Hilfe von Laserstrahlen Objektfelder ausgeschnitten werden sollen (WO 97/29354, auch WO 97/29355).

Nicht beeinflusst durch die Verwendung aufrechter Mikroskope und freigespannter Folien werden aber elektrostatische oder Kohäsionseffekte, die zu einem Anhaften des Mikrodisektates am darunterliegenden Glasobjektträger oder der umgebenden Folie führen. Dies macht die kontaktfreie Überführung besonders kleiner Mikrodisektate, bestehend etwa aus einzelnen Zellen oder subzellulären Strukturen, in die gewünschten Reaktionsgefäße aufwendig bzw. unmöglich. Weitere Phänomene, die oft zu einem Verlust besonders kleiner interessierender Probenbereiche führen, sind die unregelmäßigen Flugbahnen der

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Mikrodissektate unmittelbar nach vollständiger zirkumferentieller Isolation durch den Laserstrahl. Das letztere Phänomen tritt besonders häufig bei einzelnen freigespannten Folien auf. Eine weitere Limitation freigespannter Einzelfolien in der Lasermikrodissektion ist eine nicht selten während der Lasertrennung zu beobachtende Verziehung des Mikrodissektats aus
5 der Fokusebene heraus. Diese bewirkt im schlimmsten Falle eine Verschiebung des Mikrodissektats auf die objektivnahe, d.h. dem Auffangbehältnis abgewandte Seite der einzelnen Trägerfolie, von wo eine kontaktfreie gravitationell oder Laser-vermittelte Gewinnung nicht mehr ohne größeren Aufwand möglich ist.

Besonders die Mikrodissektion von Einzelzellen oder subzellulärer Strukturen (z.B.
10 Organellen, Zellkerne, ganze Chromosomen oder Chromosomenabschnitte) erfordern den Einsatz hochvergrößernder Immersionsobjektive (63x, 100x). Im Falle der Verwendung freigespannter Folien kommt es dabei zu direktem Kontakt von Immersionsöl und Objektiv mit der Unterseite der präparattragenden Folie. Die so gewonnenen Strukturen sind dadurch einer für die weitere Analytik empfindlich störenden Kontaminationsgefahr ausgesetzt. Dieses
15 Problem gewinnt besondere Bedeutung beim Einsatz hochempfindlicher Nachweisverfahren von Nukleinsäuren an kleinsten Mikrodissektaten.

Der Einsatz von Mikrodissektion zur selektiven Gewinnung von auf Objektträgern unter Verwendung von Standardverfahren der Zellzucht kultivierten lebenden Zellen ist mit herkömmlichen Verfahren kontaktfreier Lasermikrodissektion nicht zuverlässig möglich. Um
20 die Viabilität der Zellen während der Mikrodissektion zu erhalten, müssen diese möglichst konstant von einer wenigstens dünnen Schicht von isotoner Nährstofflösung umgeben sein. In den herkömmlichen Lasermikrodissektionsverfahren verhindern kohäsive Kräfte der Nährstofflösung eine effektive Mobilisierung isolierter Einzelzellen oder Gewebsareale in die Auffanggefäße durch gravitationelle Kräfte allein. Noch problematischer wird die Gewinnung
25 von lebenden Zellen bei Verwendung von freigespannten Einzelfolien unter hochvergrößernden Immersionsobjektiven, da das Immersionsöl durch seinen objektivseitigen Kontakt mit der Einzelfolie zusätzlich adhäsiv wirksam wird.

Aufgabe der Erfindung ist es, Mikroskopiereinrichtungen zu entwickeln, die eine zuverlässige
30 Gewinnung auch kleinster Probenbereiche ermöglichen.

Die Aufgabe wird in erster Linie durch Objektträger gelöst, die aus mindestens zwei Schichten von Trägermaterialien gebildet sind, wobei die eine – die Barrierefolie – objektivnah das Immersionsöl aufnimmt und kontaminationsverhindernd wirkt, während die

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

andere – eine Trägerfolie mit magnetischen Eigenschaften – Schnitten von fixiertem oder lebendem Gewebe sowie fixierten oder lebenden Zellen anheftet - und vom Laserstrahl mitdurchtrennt wird. Mit folgenden Schritten kann nun ein interessierender Anteil des mikroskopischen Präparats zuverlässig gewonnen werden:

- 5 • Sachgerechtes Aufbringen und Färbung eines Präparates oder Aufbringen und Kultivierung lebender Zellen oder von Gewebe auf der laserschneidbaren Seite eines Mehrfachfolien-Objektträgers (MFOT) - Zell- oder Gewebe-Trägerfolien-Verbunde des MFOT - mittels Standardverfahren der histologischen, immunhistologischen oder Zellkultur-Technik
- 10 • Einbringen des Präparates auf dem Objektträger zwischen Objektiv und Auffanggefäß in einer Weise, dass die laserschneidbare Seite des Mehrfachfolien-Objektträgers dem Auffanggefäß zugewandt ist.
- Auswählen der interessierenden mikroskopischen Struktur unter Verwendung hochauflösender Objektive
- 15 • Isolation des interessierenden Anteils mittels planar zirkumferentieller Laserablation
- Aufnahme des Mikrodissektats in das Auffanggefäß mittels magnetischer Anziehung, ausgehend von unter dem Boden des Reaktionsgefäßes / Auffanggefäßes lokalisierten Magneten.

20 Die Vorteile der Erfindung liegen in der Isolation mikroskopischer Präparatanteile, der Gewinnung auch kleinster Probenbereiche, der selektiven Gewinnung von lebenden Zellen und darin, dass Mehrfachfolien-Objektträgern (MFOT) als Substrate für die Zell- oder Gewebekultur und für lebende Zellen auf der Trägerfolienseite des MFOT adhärent aufgezogen und/oder kultiviert werden können.

25

Die nutzbaren Flächen der Mehrfachfolien-Objektträger (MFOT) sind vorgegeben durch die Abmessungen der Standardglasobjektträger (76 mm x 25 mm), im weiteren aber nur durch die Möglichkeit, glatte parallele Folienoberflächen zu erhalten.

Die Dicken der verschiedenen Folien richten sich nach den Anforderungen an die Stabilität der Barrierefolie (vorzugsweise 10-20µm) bzw. leichte Schneidbarkeit der Trägerfolie (vorzugsweise <1µm).

30

Als Folienmaterialien kommen bevorzugt transparente, zugfeste, inerte und temperaturstabile Polymere mit und ohne Absorption im Bereich der Wellenlänge des zu verwendenden Lasers

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

in Frage. Bei Verwendung eines N₂-Lasers eignen sich z.B. im UV-Lichtbereich von 322nm gut absorbierende Polyethylenterephthalate (PET) oder Polyethylenaphthalate (PEN; <http://www.dupontteijinfilms.com/datasheets/q71.htm>) als Träger- und gering absorbierende Polyethersulfone (PES) als Barrierefolien.

- 5 Die Trägerfolien werden erfindungsgemäß mittels verschiedener Verfahren mit magnetischen Eigenschaften versehen:

Durch einseitiges Auftrocknen einer Lösung oder Suspension von magnetischen Partikeln, insbesondere von Lösungen bzw. Suspensionen kubischen Magnetits (Fe₃O₄) oder von Dextranpartikeln sowie durch Koextrusion einer Dispersion von Magnetit und PET / PEN bei
10 der Folienherstellung.

Die erfindungsgemäßen Mikrodissektionseinrichtungen können entweder einen feststehenden Laserstrahl und einen verfahrbaren xy-Tisch oder einen ablenkbaren Laserstrahl bei feststehender Probe aufweisen. Ein überraschender Vorteil der Erfindung besteht darin, dass
15 die oben beschriebenen Verluste des Mikrodissektats durch Verziehen während des Schneideprozesses durch die Barrierefolie effektiv verhindert werden. Durch den Einsatz magnetischer Kräfte in Richtung auf das Auffanggefäß werden ferner mechanische Verkeilungs- und/oder elektrostatische Adhäsionseffekte zwischen Mikrodissektat und dem restierenden Präparat überwunden und tragen so zur Erreichung einer deutlich gesteigerten
20 Gewinnungsrate gegenüber Einzelfolienobjektträger verwendenden Verfahren bei.

Ferner kann das Mikrodissektat sowohl nach oben im Falle einer inversen Mikroskop-Architektur als auch nach unten im Falle der aufrechten Mikroskop-Architektur in das Reaktionsgefäß / Auffanggefäß verbracht werden.

Das Reaktionsgefäß / Auffanggefäß besteht aus einem transparenten Napf, in dessen Basis
25 konzentrisch ein Magnet unterlegt ist. Dieser kann als ringförmiger Dauermagnet in die Kunststoffform integriert sein oder als Elektromagnet dem Gefäß als Halterung dienen.

Als eine besondere erfindungsgemäße Ausführungsform sind Mehrfachfolien-Objektträger (MFOT) für die Lasermikrodissektion (LMD) entwickelt worden.

Die Herstellung von qualitativ hochwertigem Verbrauchsmaterial stellt eine besonders
30 kritische Voraussetzung für die Operationalität sämtlicher Mikrodissektionsverfahren dar. Für eine zuverlässige Mobilisierbarkeit auch kleinster interessierender Gewebestrukturen von MFOT wurden die im folgenden spezifizierten Faktoren als besonders kritisch erkannt:

1. Hochreine Folienoberflächen

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Die verwendeten Barriere- und Trägerfolienmaterialien müssen generell vollständig fett- und klebstofffrei sein, um eine leichte Lösung der beiden im freigespannten Bereich möglichst planar einander anliegenden Folien im Mikrodisspektatareal zu erreichen.

2. Lösungsmittel- und Temperaturreistente sowie flüssigkeitsdichte Verklebung

- 5 Unter den für die Gewebssfixierung, Entparaffinierung und Färbung verwendeten Chemikalien stellen organische Lösungsmittel, wie Xylol, die aggressivsten Substanzen dar. Um kapillarattraktionsvermittelte Folien-Adhärenzphänomene zu vermeiden, muss die randliche Verklebung der Barriere- und Trägerfolienmaterialien flüssigkeitsdicht sein. Ferner kann bei einem Einsatz der MFOT in der Gewebekultur der Gebrauch von Sterilisationsverfahren und
10 damit eine Stabilität der MFOT unter herkömmlichen Autoklavierbedingungen notwendig werden. Um dies zu erreichen, wurden 75 mm x 21 mm messende Plättchen aus handelsüblichem Epoxydharz-Leiterplattenbasismaterial (FR-4) von 1mm Dicke vollflächig mit Transferfolienkleber (z.B. der Acrylatdispersionskleberfolie 467MP der Firma 3M Deutschland GmbH) laminiert und in dieses Laminat rechteckige Fenster der Dimension
15 51mm x 18 mm geätzt. Kleberseitig wurden dann PES-Folie von 20µm Dicke straff auflaminiert und dieses komplexe Laminat PES-folienseitig im Siebdruckverfahren unter Auslassung der ausgeätzten Areale mit einer etwa 20-30µm dünnen Kleberschicht (wässriger Acrylatdispersions-Siebdruck-Klebstoff SP4533 der Firma 3M Deutschland GmbH) versehen. Auf diese Kleberschicht wurden dann PEN- (TEONEX Q71 der Firma DuPont Teijin;
20 <http://www.dupontteijinfilms.com/datasheets/q71.htm>) oder PET-Folien von <2µm bzw. <1µm Dicke straff auflaminiert. Wesentlich ist, dass die beiden Folien im freigespannten Bereich möglichst distanzfrei planar anliegen.

3. Kompatibilität mit Verfahren der Immunhistochemie

- Bei Verwendung von Methoden zur hitzeinduzierten Wiedergewinnung von Epitopen (sog.
25 "heat induced epitope retrieval" - HIER) werden üblicherweise die auf speziell oberflächenbehandelte Objektträger aufgezogenen Paraffinschnitte zwischen 1 und 10 Minuten in Zitrat- oder Ethylendiamin-Tetraessigsäure-(EDTA) Puffern im Dampfdrucktopf gekocht. Dies stellt sowohl für die Adhärenz der Schnitte auf der Trägerfolie als auch für die Dichtigkeit der Folienverbindung eine besondere Belastung dar. Es konnte erfindungsgemäß
30 ein Herstellungsverfahren für Mehrfachfolienobjektträger (MFOT) entwickelt werden, welches zweiminütiges HIER in pH 6.0 Zitratpuffer bei guter Funktionalität ermöglicht.

4. Kompatibilität mit Verfahren der Zell- und Gewebekultur

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Durch Verwendung von MFOT als Substrate für die Zell- oder Gewebekultur können unter Verwendung von zellbiologischen Standardverfahren der Zellzucht lebende Zellen auf der Trägerfolienseite des MFOT adhärent aufgezogen und/oder kultiviert werden. Dies ermöglicht die Verwendung der Lasermikrodissektion zur selektiven Gewinnung von lebenden Zellen.

- 5 Um die Viabilität der Zellen während der Lasermikrodissektion nicht zu beeinträchtigen, müssen diese möglichst immer von einer wenngleich dünnen Schicht von Kulturmedium auf der Trägerseite des MFOT umgeben sein. In den herkömmlichen Lasermikrodissektionsverfahren verhindern kohäsive Kräfte in der Mediumflüssigkeit eine effektive Mobilisierung isolierter Einzelzellen oder Gewebsareale in die Auffanggefäße. Völlig unmöglich wird die Gewinnung von lebenden Zellen bei Verwendung von freigespannten Einzelfolien unter hochvergrößernden Immersionsobjektiven, da das Immersionsöl durch seinen objektivseitigen Kontakt mit der Einzelfolie zusätzlich adhäsiv wirksam wird. Durch die erfindungsgemäße Verwendung einer magnetischen Trägerfolie im MFOT-Format wird eine leichtere Gewinnbarkeit von lebenden Zellen mit der Mikrodissektion ermöglicht.

- 15 In der Tabelle sind die Eigenschaften und Einsatzgebiete herkömmlicher Folienobjektträger und Beispiele erfindungsgemäßer Mehrfachfolienobjektträger zusammengestellt.

Tabelle : Eigenschaften und Einsatzbereiche unterschiedlicher Folienobjektträger (FOT)-Varianten

20

FOT-Typ	Objektiv-vergrößerung	Anwendung	Vorteil	Nachteil
Freigespannte Einzelfolie	Trocken (2x-63x) Ölimmersion (63x-100x)	"Bulk"-Mikrodissektion		Unzuverlässige Gewinnung kleiner Mikrodissektate, Kontaminations-gefahr
Doppelfolie	Trocken (2x-63x) Ölimmersion (63x-100x)	Einzelzell- und subzelluläre Analytik	Objektivseitige Kontaminationsbarriere	
Doppelfolie mit magnetisierbarer Trägerfolie	Trocken (2x-63x) Ölimmersion (63x-100x)	Einzelzell- und subzelluläre Analytik, Isolation lebender Zellen	Objektivseitige Kontaminationsbarriere Zuverlässige Mikrodissektatgewinnung	

Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Die Merkmale aus bekannten und neuen Elementen ergeben in ihrer Gesamtheit einen synergistischen Effekt, der zu den erfindungsgemäßen neuen Mikroskopier- und Lasermikrodissektionseinrichtungen führt.

- 5 Zusammengefasst besteht die Erfindung in einer Mikrodissektionsvorrichtung zur Isolation mikroskopischer Präparatanteile in einer Mikroskopiereinrichtung, in der Objektträger eingesetzt werden, die aus mindestens einem magnetisierbaren oder magnetischen Träger bestehen.
- 10 Die Objektträger, die aus mindestens zwei Schichten von Trägermaterialien aus Kunststoff bestehen, werden in der Lasermikrodissektion zum einen als Barrierefolie und zum anderen als Trägerfolie mit magnetischen Eigenschaften eingesetzt. Die Objektträger sind als Einzelfolien- oder Mehrfachfolien-Objektträger ausgelegt.
- Die erfindungsgemäßen Mehrfachfolienobjektträger sind dadurch herstellbar, dass auf einen
- 15 Rahmen, auf den flächig ein Kleber A aufgebracht ist, der eine Barrierefolie aus Kunststoff fixiert, flächig ein weiterer Kleber B aufgebracht wird, der eine Trägerfolie aus einem weiteren Kunststoff fixiert und der zweite Kleber B so stark komprimiert wird, dass im freigespannten Bereich beide Folien einander planar aufliegen und die der Barrierefolie zugewandte Seite magnetische Partikel trägt.
- 20 Die erfindungsgemäßen Trägerfolien bestehen aus Kunststofffolien und magnetischen oder magnetisierbaren Verbindungen bzw. Partikeln, insbesondere Dextranpartikeln oder kubischem Magnetit (Fe_3O_4). Hergestellt werden sie dadurch, dass man auf Kunststofffolien die Suspensionen von magnetischen Dextranpartikeln oder Lösungen bzw. Suspensionen kubischen Magnetits (Fe_3O_4) einseitig aufrocknet. Sie lassen sich auch durch Koextrusion
- 25 einer Dispersion von Magnetit und Kunststofffolien herstellen. Die Herstellung von magnetischen PET- oder PEN-Trägerfolien beruht darauf, dass auf PEN oder PET die Suspensionen von magnetischen Dextranpartikeln oder Lösungen kubischen Magnetits (Fe_3O_4) einseitig aufgetrocknet werden oder Dispersionen von Magnetit und PEN oder PET koextrudiert werden.
- 30 Die erfindungsgemäßen Zell- oder Gewebe-Trägerfolien-Verbunde des MFOT bestehen aus einem Mehrfachfolien-Objektträger und einer Zell- oder Gewebe-Kultur auf der laserschneidbaren Seite des MFOT. Hergestellt werden sie dadurch, dass man unter

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Verwendung von zellbiologischen Standardverfahren der Zellzucht Gewebe oder lebende Zellen auf der Trägerfolienseite des MFOT adhärent aufzieht und/oder kultiviert.

Die Anwendung der Erfindung liegt in der Isolation mikroskopischer Präparatanteile und in der Gewinnung auch kleinster Probenbereiche, wie der selektiven Gewinnung von lebenden
5 Zellen.

In den Zeichnungen ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

- Fig. 1: einen erfindungsgemäßen Mehrfachfolienobjektträger mit Gewebeschnitt im
10 Querschnitt
- Fig. 2: einen erfindungsgemäßen Mehrfachfolienobjektträger in perspektivischer Ansicht
- Fig. 3: ein erfindungsgemäßes Auffanggefäß für auf magnetische Trägerfolie aufgezogene Gewebeschnitte im Querschnitt
- 15 Fig. 4: ein erfindungsgemäßes Auffanggefäß für auf magnetische Trägerfolie aufgezogene Gewebeschnitte in perspektivischer Ansicht
- Fig. 5: Verwendung eines erfindungsgemäßen Mehrfachfolienobjektträgers bei der Mikrodissektion in einer aufrechten Mikroskop-Architektur
- Fig. 6: Verwendung eines erfindungsgemäßen Mehrfachfolienobjektträgers bei der
20 Mikrodissektion in einer inversen Mikroskop-Architektur

Fig. 1 zeigt schematisch einen erfindungsgemäßen Objektträger 1 mit einem Präparat 2 im Querschnitt. Der Objektträger 1 besteht aus einem Rahmen 3, auf den flächig ein KleberA 4 aufgebracht ist, der eine 20µm dicke Barrierefolie 5 aus Polyethersulfon (PES) fixiert. Auf die
25 Folie 5 ist flächig ein weiterer KleberB 6 aufgebracht, der eine 0,9µm dicke Trägerfolie 7 aus Polyethylenterephthalat (PET) fixiert. Abweichend von der schematisierten Darstellung ist der mittels Siebdruck aufgebrachte Kleber 6 nach Lamination der Trägerfolie 7 so stark komprimiert, dass diese im freigespannten Bereich der Barrierefolie 5 planar aufliegt. Die der Barrierefolie zugewandte Seite der Trägerfolie 7 ist mit magnetischen Polymeren,
30 insbesondere mit magnetischen Dextranpartikeln 8 (Grüttner C, Teller J New types of silica-fortified magnetic nanoparticles as tools for molecular biology applications. J Magn Magn Mat 1999;194: 8-15) beschichtet.

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Fig. 2 zeigt schematisch einen erfindungsgemäßen Objektträger 1 mit einem Präparat 2 in perspektivischer Ansicht. Der Objektträger 1 besteht aus einem Rahmen 3, auf den flächig ein Kleber 4 aufgebracht ist, der eine 20µm dicke Barrierefolie 5 aus Polyethylensulfon (PES) fixiert. Auf die Folie 5 ist flächig ein weiterer Kleber 6 aufgebracht, der eine 0.8µm dicke Trägerfolie 7 aus Polyethylenterephthalat (PET) fixiert. Der Rahmen 3 ist exzentrisch ausgeschnitten, um die Nahebringung hochvergrößernder Immersionsobjektive zu ermöglichen.

Fig. 3 zeigt schematisch ein erfindungsgemäßes Auffanggefäß 9 für die gewonnenen Mikrodissektate. Ein Napf 10 aus transparentem Kunststoff mit 7,5mm Durchmesser und 4 mm Wandhöhe ist unterlegt von einem NdFeB-Ringkernmagneten 11 mit einem Außendurchmesser von 7,5mm, einem Innendurchmesser von 3,0 mm und einer Höhe von 1,5 mm. Die linke Zeichnung zeigt das Auffanggefäß in unbeschicktem Zustand, während in der rechten Zeichnung ein Mikrodissektat 12 durch die magnetische Anziehungskraft zwischen Ringkernmagnet und der magnetischen Trägerfolie auf dem Boden des Gefäßes lokalisiert ist.

Fig. 4 zeigt schematisch ein erfindungsgemäßes Auffanggefäß 9 für auf magnetische Trägerfolie aufgezoogene Gewebeschnitte 12 in perspektivischer Ansicht. Ein Napf 10 aus transparentem Kunststoff mit 7,5mm Durchmesser und 4 mm Wandhöhe ist unterlegt von einem NdFeB-Ringkernmagneten 11 mit einem Außendurchmesser 7,5mm, einem Innendurchmesser von 3,0 mm und einer Höhe von 1,5 mm. Der Doppelpfeil markiert die magnetische Anziehungskraft zwischen Ringkernmagnet und der magnetischen Trägerfolie des Mikrodissektates 12.

Fig. 5 zeigt schematisch einen erfindungsgemäßen Aufbau zur Mikrodissektion. Das aufrechte Mikroskop 21 umfasst einen verfahrbaren Tisch 13, auf dem der MFOT 1 fixiert werden kann. An der Unterseite - das ist die der Barrierefolie zugewandte Seite der Trägerfolie 7 - des MFOT 1 ist das zu mikrodissezierende Präparat 2 aufgezoogen. Das Präparat wird entlang der optischen Achse 16 von einer Beleuchtungsquelle 20 illuminiert und kann zur Auswahl des interessierenden Präparateanteils durch das Okular 15 inspiziert werden. Die Isolation des interessierenden Präparateanteils durch Laserablation kann entweder durch Verfahren des Objektträgertischs 13 oder durch optische Ablenkung des aus der Laserquelle 18 gespeisten Laserstrahls 19 erfolgen. Nach vollständig zirkumferentieller Isolation wird das

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Mikrodissektat durch die magnetische Anziehungskraft des NdFeB-Ringkernmagnet 11 in das auf der Auffanggefäßhalterung 17 angebrachte Auffanggefäß 9 hinein verbracht.

Fig. 6 zeigt schematisch einen erfindungsgemäßen Aufbau zur Mikrodissektion. Das inverse
5 Mikroskop 21 umfasst einen verfahrbaren Tisch 13, auf dem der MFOT 1 fixiert werden
kann. An der der Barrierefolie zugewandten Seite der Trägerfolie 7 (Unterseite) des MFOT 1
ist das zu mikrodissezierende Präparat 2 aufgezogen. Das Präparat wird entlang der optischen
Achse 16 von einer Beleuchtungsquelle 20 illuminiert und kann zur Auswahl des
interessierenden Präparateanteils durch das Okular 15 inspiziert werden. Die Isolation des
10 interessierenden Präparateanteils durch Laserablation kann entweder durch Verfahren des
Objektträgertischs 13 oder durch optische Ablenkung des aus der Laserquelle 18 gespeisten
Laserstrahls 19 erfolgen. Nach vollständig zirkumferentieller Isolation wird das
Mikrodissektat durch die magnetische Anziehungskraft des NdFeB-Ringkernmagnet 11 in das
auf der Auffanggefäßhalterung 17 angebrachte Auffanggefäß 9 hinein verbracht.

15

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

Bezugszeichen

	1	Folienobjektträger
5	2	Präparat
	3	Rahmen
	4	Kleber A
	5	Barrierefolie
	6	Kleber B
10	7	Trägerfolie
	8	magnetische Dextranpartikel
	9	Auffanggefäß
	10	Napf aus transparentem Kunststoff
	11	NdFeB-Ringkernmagnet
15	12	Mikrodissektat
	13	Objektträgertisch
	14	Objektiv
	15	Okular
	16	optische Achse
20	17	Auffanggefäßhalterung
	18	Laserquelle
	19	Laserstrahl
	20	Beleuchtungsquelle
	21	Mikroskop

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

14

Schutzansprüche

1. Mikroskopiereinrichtung der Mikrodissektion zur Isolation mikroskopischer Präparatanteile, bestehend aus Objektträgern, die aus mindestens einem magnetisierbaren oder
5 magnetischen Träger aufgebaut sind.
2. Mikroskopiereinrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Objektträger, die aus mindestens zwei Schichten von Trägermaterialien aus Kunststoff bestehen, in der Lasermikrodissektion zum einen als Barrierefolie und zum anderen als Trägerfolie mit
10 magnetischen Eigenschaften ausgelegt sind.
3. Mikroskopiereinrichtung nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Objektträger als Einzelfolien- oder Mehrfachfolien-Objektträger ausgelegt sind.
- 15 4. Mikroskopiereinrichtung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie zur Gewinnung eines mikroskopischen Präparats – eines Mikrodissektats - durch Aufbringen und Kultivieren lebender Zellen auf der laserschneidbaren Seite eines Mehrfachfolien-Objektträgers (MFOT) gewonnene Zell- oder Gewebe-Trägerfolien-Verbunde des MFOT enthält.
- 20 5. Mikroskopiereinrichtung nach den Ansprüchen 1 bis 4 aus Objektträgertisch, Objektiv, Okular, Laserquelle, Laserstrahl und Beleuchtungsquelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie neben den Objektträgern für mikroskopische Präparate in Mikrodissektionsverfahren aus einem Auffanggefäß mit einer Auffanggefäßhalterung besteht, das die gewonnenen
25 Mikrodissektate enthält.
6. Objektträger aus den Ansprüchen 1 bis 5 in der Lasermikrodissektion, bestehend aus mindestens zwei Schichten von Trägermaterialien aus Kunststoff.
- 30 7. Objektträger nach Anspruch 6, bestehend aus einer Barrierefolie und einer Trägerfolie mit magnetischen Eigenschaften.
8. Objektträger nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Barrierefolie zur Aufnahme des Immersionsöls objektivnah angeordnet ist und die Trägerfolie mit

DE 201 11 939 U1

B 15.07.01

45

magnetischen Eigenschaften Schnitten von fixiertem oder lebendem Gewebe sowie fixierten oder lebenden Zellen anheftet und vom Laserstrahl mitdurchtrennt wird.

- 5 9. Objektträger (1) nach den Ansprüchen 6 bis 8, bestehend aus einem Präparat (2), einem Rahmen (3), auf den flächig ein Kleber A (4) aufgebracht ist, der eine Barrierefolie (5) fixiert, auf die flächig ein weiterer Kleber B (6) aufgebracht ist, der eine Trägerfolie (7) fixiert, wobei die der Barrierefolie 5 zugewandte Seite der Trägerfolie (7) mit magnetischen Partikeln - Dextranpartikeln (8) - beschichtet ist.
- 10 10. Objektträger nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Rahmen (3) exzentrisch ausgeschnitten ist.
11. Auffanggefäß aus Anspruch 5, bestehend aus einem Napf aus transparentem Kunststoff und einem Ringkernmagneten.
- 15 12. Auffanggefäß nach den Ansprüchen 5 und 11, das ein Mikrodisssektat durch die magnetische Anziehungskraft zwischen Ringkernmagnet und der magnetischen Trägerfolie auf dem Boden des Gefäßes lokalisiert.
- 20 13. Auffanggefäß (9) nach den Ansprüchen 5, 11 und 12, bestehend aus dem Napf (10) aus transparentem Kunststoff, der von einem NdFeB-Ringkernmagneten (11) unterlegt ist und der Napf (10) das gewonnene Mikrodisssektat (12) enthält.
- 25 14. Trägerfolien aus einem der Ansprüche 2, 7, 8 oder 9, bestehend aus Kunststofffolien und
- 14.1. magnetischen oder magnetisierbaren Verbindungen
- 14.2. kubischem Magnetit (Fe_3O_4) oder
- 14.3. magnetischen Dextranpartikeln.
- 30 15. Trägerfolien nach Anspruch 14 als magnetische PET- oder PEN-Trägerfolien, gewonnen dadurch, dass auf PEN oder PET
- 15.1. Lösungen kubischen Magnetits (Fe_3O_4) oder
- 15.2. Suspensionen von magnetischen Dextranpartikeln einseitig aufgetrocknet werden oder
- 15.3. Dispersionen von Magnetit und PEN oder PET koextrudiert werden.

DE 201 11 939 01

B 15.07.01

AG

16. Zell- oder Gewebe-Trägerfolien-Verbunde des MFOT aus Anspruch 4, bestehend aus einem Mehrfachfolien-Objektträger und einer Zell- oder Gewebe-Kultur auf der laserschneidbaren Seite des MFOT.

5

17. Mikroskopiereinrichtung (21, Fig. 5 und 6) zur Isolation mikroskopischer Präparatanteile (2) nach den Ansprüchen 1 bis 5, bestehend aus Objektträgertisch (13), Objektiv (14), Okular (15), Laserquelle (18), Laserstrahl (19) und Beleuchtungsquelle (20), dadurch gekennzeichnet, dass sie Objektträger (1) - bestehend aus einem Präparat (2), einem Rahmen (3), auf den flächig ein Kleber (4) aufgebracht ist, der eine Barrierefolie (5) fixiert, auf die flächig ein weiterer Kleber (6) aufgebracht ist, der eine magnetisierbare oder magnetische Trägerfolie (7) fixiert, wobei die der Barrierefolie zugewandte Seite der Trägerfolie (7) mit magnetischen Dextranpartikeln (8) beschichtet ist - und ein Auffanggefäß (9) - bestehend aus einem Napf (10) aus transparentem Kunststoff, der von einem NdFeB-Ringkernmagneten (11) unterlegt ist und der Napf (10) das gewonnene Mikrodisspektat (12) aufnimmt - enthält.

10

15

DE 201 11 939 U1

8 15.07.01

Fig. 1

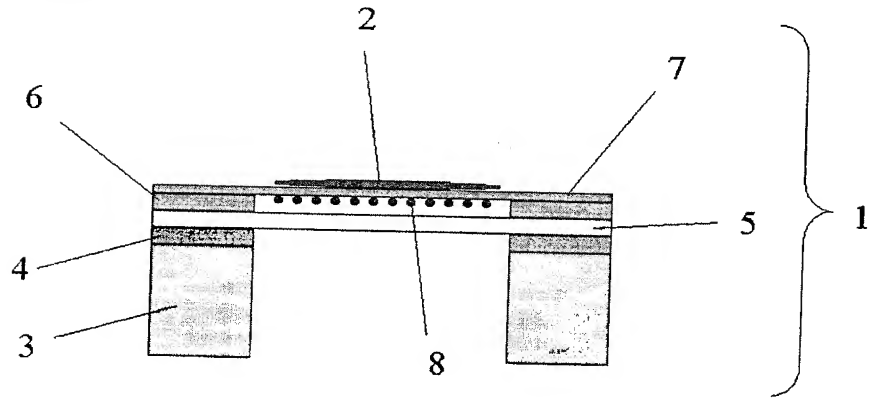
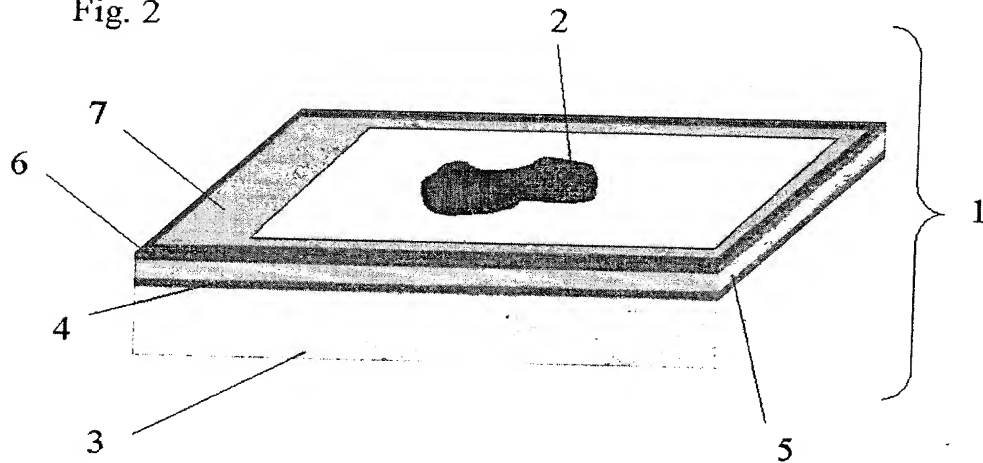


Fig. 2



DE 201 11 939 U1

Fig. 3

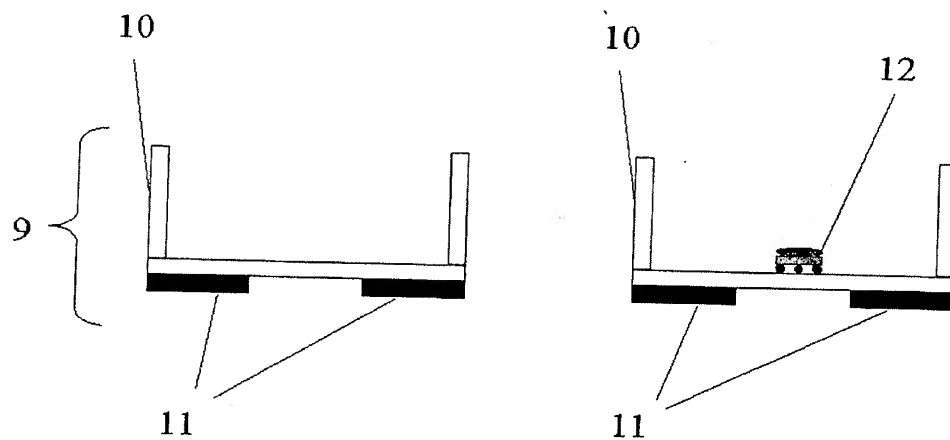
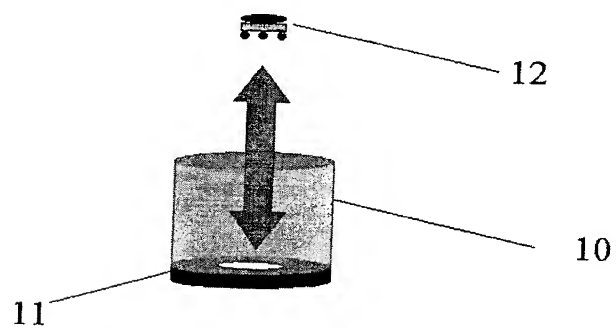


Fig. 4



B 15.07.01

Fig. 5

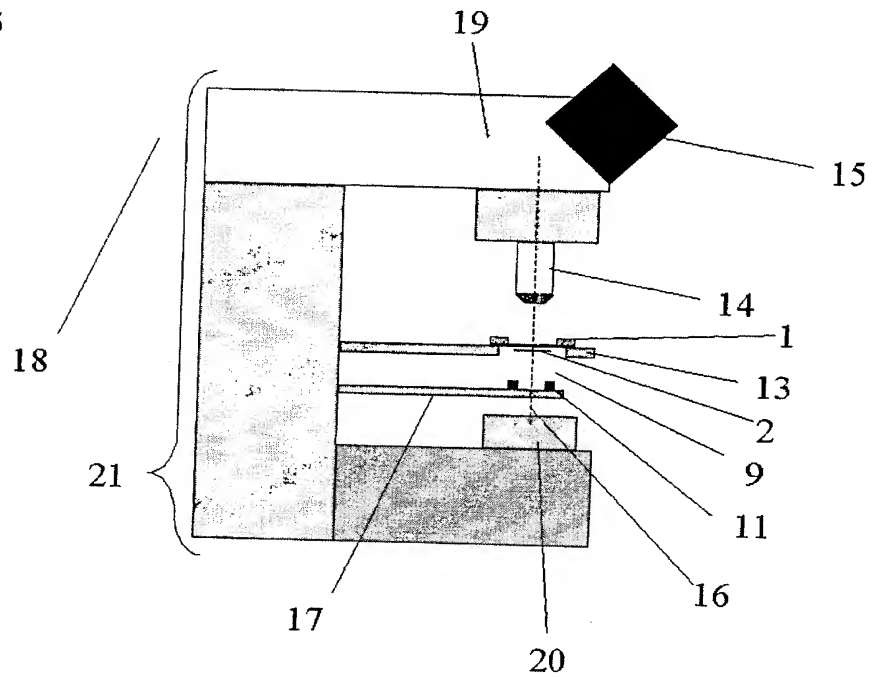
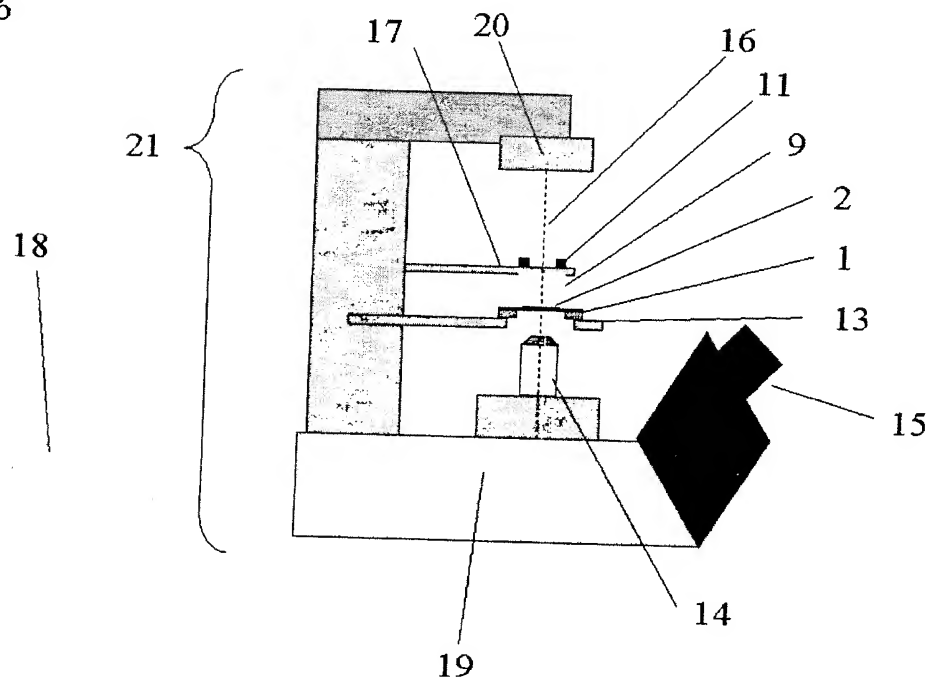


Fig. 6



DE 201 11 939 U1